

# UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN NANOPARTIKEL KITOSAN DARI LIMBAH KULIT UDANG *Litopenaeus vannamei* MENGUNAKAN METODE DPPH

Yauwan Tobing Lukiyono<sup>\*1</sup>, Giftania Wardani Sudjarw<sup>2</sup>, Moh. Nizar Ariful Haq<sup>3</sup>, Mahmiah<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Prodi Analis Kesehatan Universitas Nahdlatul Ulama, Surabaya

<sup>2,3,4</sup>Prodi Farmasi Universitas Hang Tuah, Surabaya

<sup>1</sup>Jl. Jemursari No 57, Surabaya, 60237, Indonesia

<sup>2,3,4</sup>Jl. Arief Rahman Hakim No 150, Surabaya, 60111, Indonesia

#tobing@unusa.ac.id, giftania.wardani@hangtuah.ac.id, nizarhaq33@gmail.com, mahmiah@hangtuah.ac.id

**Abstract**—Antioxidants are compounds that have an important role in maintaining health because it can prevent free radicals, thus inhibit oxidation reactions in the body causes various degenerative diseases. This study aims to analyze the utilization of chitosan nanoparticles derived from waste shell shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as an antioxidant. Antioxidant activity qualitatively tested with Thin Layer Chromatography (TLC) autograph. The result obtained from Chitosan nanoparticles produces a clear stain with a violet background. Then quantitative testing used DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method with spectrophotometer UV-Visible by calculating the free radical inhibition percentage by chitosan nanoparticles at a wavelength of 516,5 nm by using vitamin C as the comparison with IC<sub>50</sub> value of 2,4703 ppm. Chitosan nanoparticles haven't an antioxidant activity with IC<sub>50</sub> value of 2731,9 ppm.

**Keywords**—Chitosan Nanoparticles, Antioxidant, TLC Autograph, DPPH, IC<sub>50</sub>.

**Abstrak**—Antioksidan adalah senyawa yang memiliki peranan penting dalam menjaga kesehatan karena dapat menangkalkan radikal bebas, sehingga menghambat reaksi oksidasi dalam tubuh penyebab berbagai penyakit degeneratif. Pada penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pemanfaatan nanopartikel kitosan dari limbah kulit udang (*Litopenaeus vannamei*) sebagai antioksidan. Uji aktivitas secara kualitatif dilakukan dengan metode KLT autografi. Hasil yang diperoleh dari nanopartikel kitosan menghasilkan noda tidak berwarna dengan latar belakang berwarna ungu. Dan pada pengujian secara kuantitatif dilakukan dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) menggunakan spektrofotometer UV-Visible dengan mengukur % Peredaman radikal bebas oleh nanopartikel kitosan pada panjang gelombang 516,5 nm dengan menggunakan vitamin C sebagai pembandingan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 2,4703 mg/l. Nanopartikel kitosan tidak memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 2731,9 ppm setara dengan 2731,9 mg/l.

**Kata kunci**—Nanopartikel Kitosan, Antioksidan, KLT Autografi, DPPH, IC<sub>50</sub>, ppm

## I. PENDAHULUAN

Pada perkembangan zaman saat ini, khususnya dalam perubahan gaya hidup masyarakat modern yang cenderung tidak sehat dan juga tingginya tingkat stress menyebabkan meningkatnya penyakit degeneratif. Salah satu pemicunya adalah stres oksidatif atau akibat oksidasi yang tinggi. Menurut data statistik dari studi WHO, hingga tahun 2018 kematian akibat penyakit degeneratif seperti kanker, jantung, stroke, dan diabetes sudah memakan hampir 36 juta jiwa. Diperkirakan dimana pada tahun 2030 akan ada 52 juta jiwa kematian akibat penyakit tersebut. Stres oksidatif merupakan ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan. Radikal bebas dapat menyerang DNA sehingga menyebabkan mutasi pada sel. Sel yang bermutasi ini akan memiliki fungsi dan siklus yang abnormal, sehingga sel akan rusak. Adanya radikal bebas yang berlebih di dalam tubuh dapat menyebabkan stres oksidatif<sup>7</sup>. Untuk mencegah terjadinya efek yang tidak diinginkan dari radikal bebas tersebut diperlukan antioksidan.

Antioksidan diperlukan untuk mencegah terjadinya stres oksidatif yang berperan penting dalam terjadinya

penyakit degeneratif<sup>3</sup>. Mekanisme pencegahannya adalah reaksi senyawa antioksidan dengan radikal bebas sehingga radikal bebas bersifat tidak reaktif, menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi rantai dari radikal bebas (10).

Antioksidan terdiri dari dua jenis yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan yang berasal dari bahan alam, antioksidan sintetik yang banyak digunakan untuk makanan yaitu BHA (*Butylated Hydroxyl Anisole*), BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) dan profil galat. Namun dilaporkan bahwa penggunaan antioksidan sintetik memberikan efek karsinogenik. Hal ini dapat terjadi jika penggunaan dosis antioksidan sintesis ini melebihi batas yang ditetapkan yaitu 0,01-0,1% (9). Antioksidan alami dapat berasal dari sumberdaya alam yang berasal dari darat maupun laut. Salah satu antioksidan alami yang berasal dari sumberdaya laut adalah kitosan<sup>5</sup>.

Kemampuan kitosan dalam menghambat radikal bebas tergantung pada adanya reduktor yang menunjukkan potensi sebagai antioksidan dalam hal memutus rantai radikal bebas

dengan mendonorkan atom hidrogen<sup>1</sup>. Pada pengujian aktivitas antioksidan terdapat beberapa metode yang digunakan, salah satunya adalah dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dimana mengukur aktivitas perendaman radikal bebas dari DPPH tersebut. Metode DPPH merupakan metode yang mudah, sederhana, dan cepat dalam mengetahui potensi pada sampel meski pun dengan harga yang mahal (12).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan penelitian mengenai pembuatan nanopartikel kitosan dengan menggunakan metode ball milling dengan hasil range ukuran partikel 220 nm – 920 nm dan zeta potensial dengan rata rata 4,91 mV (13). Kitosan memiliki kekurangan dari segi kelarutan yaitu tidak larut dalam air dan pelarut organik (6). Sehingga diperlukan modifikasi secara fisika untuk meningkatkan kelarutan kitosan, oleh sebab itu dilakukan pengecilan ukuran partikel kitosan (nanopartikel kitosan), karena semakin kecil ukuran partikel suatu bahan maka semakin besar luas permukaan zat sehingga kecepatan melarut bahan tersebut semakin meningkat (6). Berdasarkan uraian tersebut maka, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan nanopartikel kitosan dari limbah kulit udang menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

## II. METODE PENELITIAN

### A. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah : nanopartikel kitosan (yang diperoleh dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sudjarwo, 2018), asam asetat 2%, etanol P.A, DPPH Sigma Aldrich®, Vitamin C.

Alat yang akan digunakan adalah alat gelas, timbangan analitik, kuvet HERMA®, spektrofotometer UV-Vis SHIMADZU 2600®, tissue lensa, lampu sinar UV.

### B. PROSEDUR PENELITIAN

#### 1. Uji Kualitatif Aktivitas Antioksidan Dengan KLT Autografi

Larutan nanopartikel kitosan ditotolkan sebanyak 5 µL menggunakan pipa kapiler pada titik awal penotolan permukaan lempeng KLT. Untuk menentukan bercak yang mempunyai aktivitas antioksidan, plat KLT di semprotkan larutan DPPH (yang dilarutkan dengan etanol PA) sebagai pereaksi yang dapat memberikan hasil positif berupa zona kuning dengan latar belakang ungu<sup>11</sup>.

#### 2. Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Langkah – langkah yang dilakukan dalam melakukan uji adalah sebagai berikut (3,2,15) :

Larutan DPPH yang akan digunakan dibuat dengan menggunakan DPPH dalam pelarut etanol dengan konsentrasi  $5 \times 10^{-5}$  M. Larutan dijaga pada suhu kamar, terlindung dari cahaya untuk segera digunakan. Nanopartikel kitosan sebagai larutan yang akan diuji dibuat baku induk 1000 ppm dalam asam asetat 2%, kemudian dibuat larutan dengan 5 konsentrasi

berbeda (50, 100, dan 300 µg/ml) dengan vitamin C sebagai kontrol positif.

Sebanyak 1 mL Larutan Uji dan kontrol positif masing-masing dicampur dengan 1 ml larutan DPPH, 2 ml Buffer Asetat (pH5,5). Campuran tersebut kemudian diinkubasi selama 15 menit dalam keadaan gelap pada suhu ruang. Mengukur absorbansi larutan uji, larutan pembanding dan larutan kontrol positif dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 511; 516, 5 dan 521 nm. Aktivitas antioksidan senyawa uji terhadap pereaksi DPPH dapat dihitung absorbansinya sebagai berikut :

$$\text{Absorbansi Hitung } \lambda_{517\text{nm}} = A_{517} - \frac{A_{479} - A_{537}}{2}$$

Perhitungan kapasitas antioksidan sebagai proses peredaman absorbansi terhadap radikal bebas DPPH dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ peredaman DPPH} = 1 - \frac{\text{absorbansi larutan Uji}}{\text{Absorbansi DPPH}} \times 100\%$$

Data % peredaman DPPH yang di dapat dari hasil perhitungan absorbansi pada pengukuran dengan spektrofotometri UV-Vis akan di analisis dan dihitung nilai IC<sub>50</sub> melalui persamaan regresi linear. Presentase penghambatan (% peredamaan DPPH) yang diperoleh di konversikan ke persamaan regresi linear yaitu hubungan konsentrasi senyawa terhadap persentase peredaman.

Data aktivitas antioksidan pada radikal DPPH  $5 \times 10^{-5}$  M peredaman dari larutan nanopartikel kitosan dianalisis dan dihitung nilai IC<sub>50</sub>nya dan dikategorikan dengan klasifikasi seperti **Tabel 1**.

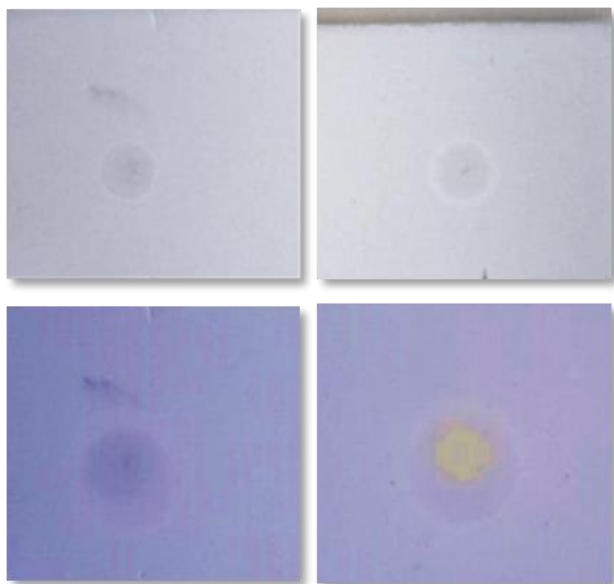
**Tabel 1.** Klasifikasi Antioksidan menurut Blois

No	Nilai IC <sub>50</sub>	Kategori Antioksidan
1	< 50 ppm	Sangat Kuat
2	50–100 ppm	Kuat
3	101–150 ppm	Sedang
4	151–200 ppm	Lemah
5	>200 ppm	Sangat Lemah

### C. HASIL

#### 1. Aktivitas Antioksidan Nanopartikel Kitosan Dan Kontrol Positif Secara Kualitatif

Pada **Gambar 1** hasil dari nanopartikel kitosan memiliki noda yang tidak berwarna dan latar belakang berwarna ungu menunjukkan bahwa nanopartikel kitosan secara kualitatif tidak memiliki aktivitas antioksidan. Berbeda dengan kontrol positif vitamin C yang memiliki hasil KLT autografi terdapat noda berwarna kuning dan latar belakang ungu (3).



**Gambar 1.** Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kualitatif

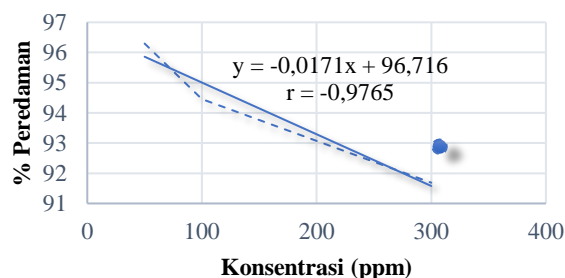
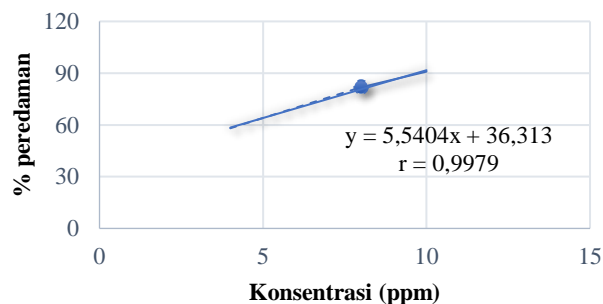
Keterangan :

1 = sebelum di  
semprot DPPH

2 = setelah disemprot  
DPPH

a = Nanopartikel  
kitosan

b = Vitamin C



**Gambar 3.** % Peredaman DPPH dari Nanopartikel kitosan

## 2. Aktivitas antioksidan nanopartikel kitosan dan kontrol positif secara kuantitatif (dengan Spektrofotometer UV-Vis)

Hasil % peredaman DPPH oleh nanopartikel kitosan dengan spektrofotometer UV-Visible pada 3 panjang gelombang terpilih yaitu 511,00nm, 516,50nm dan 521,00nm seperti yang tertera pada data yang ditampilkan pada Tabel 2 dibawah untuk peredaman DPPH oleh vitamin dan Tabel 3 untuk data absorbansi rata rata dan % peredaman yang diperoleh diolah dengan menggunakan *Microsoft Excel* untuk mendapatkan persamaan regresi linear yang digunakan dalam menghitung nilai  $IC_{50}$ .

Pada **Gambar 2**, % peredaman DPPH nanopartikel kitosan menunjukkan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi semakin kecil persen peredaman yang dihasilkan, sedangkan pada **Gambar 3** vitamin C menunjukkan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi semakin tinggi pula % peredaman yang dihasilkan

Tabel 2. Hasil Perhitungan IC<sub>50</sub> dari Nonpartikel Kitosan

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Hitung Rata-rata	% Peredaman (%)	Persamaan garis linear	IC <sub>50</sub> (ppm)
50	0,0225	96,2962	$y = -0,0171x + 96,716$ $R = -0,9765$	2731,9
100	0,033667	94,4581		
300	0,0505	91,6872		

Tabel 3. Hasil Perhitungan IC<sub>50</sub> dari Vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Hitung Rata-rata	% Peredaman (%)	Persamaan garis linear	IC <sub>50</sub> (ppm)
4	0,2533	58,0629	$y = 5,5404x + 36,313$ $R = 0,9979$	2,4703
8	0,1095	81,8708		
10	0,055	90,8940		

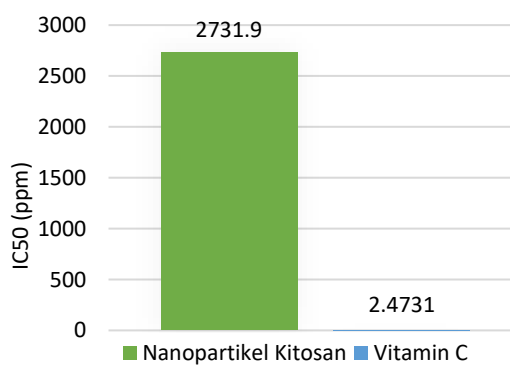
### III. PEMBAHASAN

Antioksidan merupakan senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya dengan cuma-cuma kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu fungsinya sama sekali dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (4). Pengujian secara kualitatif dilakukan dengan metode KLT (Kromatografi lapis Tipis) autografi dimana menandakan hasil positif memiliki aktivitas antioksidan apabila terdapat noda berwarna kuning dan latar belakang berwarna ungu setelah sampel yang ditotolkan pada plat KLT disemprotkan dengan larutan DPPH (3). KLT autografi pada nanopartikel kitosan memiliki noda yang tidak berwarna dan latar belakang berwarna ungu menunjukkan bahwa nanopartikel kitosan secara kualitatif tidak memiliki aktivitas antioksidan. Berbeda dengan kontrol positif vitamin C yang memiliki hasil KLT autografi terdapat noda berwarna kuning dan latar belakang ungu. Dimana warna ungu stabil dari DPPH (2,2- *diphenyl-1-picrylhydrazyl*) yang apabila bersama dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogennya, maka akan membentuk senyawa non radikal (2,2- *diphenyl-1-picrylhydrazine*) ditandai dengan hilangnya warna ungu berubah menjadi warna kuning pucat dari senyawa pikril yang masih ada (14,3).

Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif dengan menggunakan metode DPPH ini adalah adanya perubahan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan konsentrasi larutan DPPH tersebut. Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan akan memberikan warna ungu, warna ungu tersebut akan hilang dan berubah menjadi warna kuning ketika berpasangan. Perubahan intensitas warna ungu terjadi karena ada proses peredaman radikal bebas yang dihasilkan oleh bereaksinya molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul senyawa sampel sehingga terbentuk senyawa non radikal dan menyebabkan perubahan warna ungu menjadi warna kuning. Perubahan warna ini akan memberikan perubahan absorbansi pada panjang gelombang maksimum DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Visible sehingga akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai *inhibitory concentration fifty* (IC<sub>50</sub>) (17). Nilai IC<sub>50</sub> didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50%. Semakin kecil

nilai IC<sub>50</sub> maka aktivitas peredaman radikal bebas semakin tinggi (17).

Aktivitas antioksidan dari nanopartikel kitosan dari limbah kulit udang (*Litopenaus vannamei*) yang digunakan diukur pada panjang gelombang 511, 516,5 dan 521 nm kemudian menghitung nilai IC<sub>50</sub> dengan persamaan regresi linear yang didapat. Sebagai kontrol positif vitamin C memiliki nilai IC<sub>50</sub> sebesar 2,4703 ppm. dengan persamaan regresi linear yaitu  $y = 5,5404x + 36,313$  dan koefisien korelasi sebesar 0,9979, dimana dapat dikatakan vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat berdasarkan klasifikasi Blois (17). Vitamin C telah diketahui berperan sebagai antioksidan yang kuat yang dapat melindungi sel dari agen penyebab kanker, dan secara khusus mampu meningkatkan daya setiap tubuh atas kalsium (mineral untuk pertumbuhan gigi dan tulang) serta zat besi dari bahan makanan (8). Vitamin C mudah mengalami oksidasi oleh radikal bebas karena mempunyai ikatan rangkap dan dengan adanya 2 gugus -OH yang terikat pada ikatan rangkap tersebut, radikal bebas akan mencabut atom hidrogen dan menyebabkan muatan negatif pada atom oksigen yang selanjutnya akan didelokalisasi melalui resonansi, sehingga menghasilkan radikal bebas yang stabil dan tidak membahayakan (10).



Gambar 4. Tabel Perbandingan Nilai IC<sub>50</sub>

Uji aktivitas antioksidan terhadap nanopartikel kitosan menghasilkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 2731,9 ppm. dengan persamaan regresi linear  $y = -0,018x + 96,914$  dan koefisien korelasi sebesar -0,9765 yang menunjukkan bahwa terdapat hubungan berbanding terbalik antara konsentrasi dengan % Peredaman. Hal tersebut menunjukkan bahwa nanopartikel kitosan dari limbah kulit udang (*Litopenaus vannamei*) tidak memiliki aktivitas antioksidan. Karena suatu sampel dikatakan memiliki aktivitas antioksidan dengan memiliki nilai  $IC_{50} < 1000$  ppm (3).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Kurniasih, *et al.* (2018) bahwa kitosan dari kulit udang *vanamei* memiliki aktivitas antioksidan yang lemah dengan daya hambat sebesar 36,9% dengan kemurnian sebesar 94,32%. Hal tersebut menunjukkan bahwasannya kitosan seharusnya memiliki aktivitas antioksidan namun pada penelitian ini tidak didapatkan hasil aktivitas antioksidan, hal tersebut dapat disebabkan pada bahan baku yang digunakan yang didapatkan dari penelitian sebelumnya memiliki kemurnian yang rendah sehingga diduga pada bahan kitosan yang digunakan masih terdapat sisa pengotor dalam hal ini adalah protein. Menurut Pratiwi dan Panunggal. (2016) adanya protein dapat menghalangi proses penangkapan radikal bebas sehingga menghasilkan nilai  $IC_{50}$  yang tinggi dimana dalam hal ini adalah tidak adanya aktivitas antioksidan. Daya hambat radikal bebas oleh kitosan yang dihasilkan berbeda-beda, diduga perbedaan sumber bahan baku pembuatan kitosan mempengaruhi kandungan gugus fungsi yang ada dalam bahan, dimana gugus amina yaitu  $NH_2$  pada kitosan yang memegang peran dalam penangkapan radikal bebas (3). Pada **Gambar 4** nanopartikel kitosan dibandingkan dengan vitamin C memiliki perbedaan secara signifikan dimana secara umum vitamin C memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih rendah dari pada nanopartikel kitosan dari limbah kulit udang (*Litopenaus vannamei*) karena vitamin C merupakan senyawa murni. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan maka semakin tinggi aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh suatu senyawa.

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa nanopartikel kitosan dari limbah kulit udang (*Litopenaus vannamei*) secara *in vitro* dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) tidak memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 2731,9 ppm.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Dhinakaran, D. Isaac, M. Gomathi. 2017. *Antioxidant Activities of Chitin and Chitosan from Marine Lobster Panulirus Homarus from The South East Coast of India*. Journal of Advancement in Medical and Life Sciences Volume 5 / Issue 2 ISSN: 2348-294X.
- [2] Divya, K., Smitha, V. and Jisha, M.S., 2018. Antifungal, antioxidant and cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and its use as an edible coating on vegetables. *International journal of biological macromolecules*, 114, pp.572-577.
- [3] Kristanti, Alfinda Novi., Nanik Siti Aminah, Mulyadi Tanjung, Bambang Kurniadi. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya. Airlangga University Press.
- [4] Kumalaningsih, S. 2006. *Antioksidan Alami*. Turubus Anggisarana. Surabaya. Indonesia.
- [5] Kurniasih, M. and Dewi, R.S., 2018, April. Toxicity tests, antioxidant activity, and antimicrobial activity of chitosan. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 349, No. 1, p. 012037). IOP Publishing.
- [6] Kurniasih, Mardiyah, Dwi Kartika. 2011. *Sintesis Dan Karakterisasi Fisika-Kimia Kitosan*. Jurnal Inovasi, 5, pp 42-48.
- [7] Pham-Huy, L.A., He, H. and Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), p.89.
- [8] Rachmawati, R.A.N.I., Defiani, M.R. and Suriani, N.L., 2009. Pengaruh suhu dan lama penyimpanan terhadap kandungan vitamin C pada cabai rawit putih (*Capsicum frutescens*). *Jurnal Biologi Udayana*, 13(2).
- [9] Sari, A.N., 2018. Berbagai Tanaman Rempah Sebagai Sumber Antioksidan Alami. *Elkawnie*, 2(2).
- [10] Sayuti, K. and Yenrina, R., 2015. Antioksidan alami dan sintetis. *Padang. Universitas Adalas*.
- [11] Selvasundhari, L., Babu, V., Jenifer, V., Jeyasudha, S., Thiruneelakandan, G., Sivakami, R. and Anthoni, S.A., 2014. In Vitro Antioxidant Activity of Bark Extracts of *Rhizophora mucronata*. *Science, Technology and Arts Research Journal*, 3(1), pp.21-25.
- [12] Shalaby, E.A. and Shanab, S.M., 2013. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African journal of pharmacy and pharmacology*, 7(10), pp.528-539.
- [13] Sudjarwo, G.W. and Mahmiah, M., 2017. ANALISIS PROKSIMAT DAN OPTIMASI PEMBUATAN KITOSAN DARI LIMBAH KULIT DAN KEPALA UDANG WHITELEG SHRIMP (*Litopenaus vannamei*). Seminar Nasional Kelautan XII.
- [14] Wahdaningsih, S., Wahyuono, S. and Setyowati, E.P., 2013. Isolation And Identification Of Antioxidant Compounds In Fern Stems (*Alsophila Glauca* J. Sm) Using Dpph Method (2, 2 - Diphenyl - 1 - Picrylhydrazyl ). *Majalah Obat Tradisional (Traditional Medicine Journal)*, 18(1), pp.38-45.
- [15] World Health Organization, 2018. Noncommunicable diseases country profiles 2018.
- [16] Yen, M.T., Yang, J.H. and Mau, J.L., 2008. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate polymers*, 74(4), pp.840-844.
- [17] Molyneux, P., 2004, The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2), 211-21
- [18] Pratiwi, H. and Panunggal, B., 2016. *Analisis Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan pada Yogurt Ganyong (Canna edulis) Sinbiotik dengan Substitusi Kacang Merah (Phaseolus vulgaris L)* (Doctoral dissertation, Diponegoro University).